

### **III. METODE PENELITIAN**

#### **3.1. Lokasi dan Waktu Penelitian**

Penelitian ini dilaksanakan di laboratorium proteksi dan rumah kaca Balai Penelitian Sungei Putih, kecamatan Galang, kabupaten Deli Serdang. Pelaksanaan penelitian berlangsung pada bulan Juli hingga September 2016.

#### **3.2. Bahan dan Alat**

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah asap cair dari hasil kondensasi pirolisis tempurung kelapa, isolat jamur patogen penyakit gugur daun *Collectotrichum* (*Collectotrichum gloeosporioides*), aquades, *Potato Dextrose Agar* (PDA) sebagai media pertumbuhan jamur, bibit tanaman karet klon PB 260 dan bahan pendukung lainnya.

Sedangkan alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain alat pirolisa asap cair, jerigen, planimeter untuk mengukur luas pertumbuhan jamur, petridis, bor gabus, spatula, gelas ukur, autoklaf, kaca objek, kaca penutup, mikroskop, timbangan digital, jarum inokulasi, *laminar air flow*, inkubator, pinset, bunsen pembakar, *hand sprayer*, pipet tetes, *hot plate*, kaca preparat, pipet tetes, *cork borer* dan alat pendukung lainnya.

#### **3.3. Metode Penelitian**

##### **3.3.1. Percobaan di Laboratorium**

Percobaan di laboratorium dilakukan dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) Non Faktorial dengan 6 taraf perlakuan sebagai berikut :

A<sub>0</sub> : Kontrol (+), tanpa asap cair

A<sub>1</sub> : Asap cair pada konsentrasi 0,5%

A<sub>2</sub> : Asap cair pada konsentrasi 1%

A<sub>3</sub> : Asap cair pada konsentrasi 1,5%

A<sub>4</sub> : Asap cair pada konsentrasi 2%

A<sub>5</sub> : Asap cair pada konsentrasi 2,5%

A<sub>6</sub> : Fungisida berbahan aktif mankozeb pada konsentrasi 0,2%

Dengan demikian, maka jumlah ulangan yang akan digunakan adalah sebagai berikut :

$$t(r-1) \geq 15$$

$$7(r-1) \geq 15$$

$$7r-7 \geq 15$$

$$7r \geq 22 \quad r \geq 3,14 \text{ (4)}$$

Dimana :

t : jumlah perlakuan

r : jumlah ulangan

Jumlah perlakuan : 7 perlakuan

Jumlah ulangan : 4 ulangan

Jumlah plot : 28 plot

Jumlah inokulasi jamur setiap plot : 3 petridis

Jumlah seluruh inokulasi jamur : 72 petridis

Jumlah sampel pengamatan : 2 petridis

Jarak antar plot : 10 cm  
Jarak antar ulangan : 10 cm  
Total volume media per perlakuan : 150 ml

### 3.3.2. Metode Analisis Data

Metode analisis data yang dipakai adalah menggunakan Rancangan Acak Lengkap Non Faktorial dengan rumus model linier aditif :

$$Y_{ij} = \mu_0 + \sigma_j + \varepsilon_{ij}$$

Dimana ;

$Y_{ij}$  : Hasil Pengamatan yang mendapat perlakuan taraf ke-j dan ditempatkan di ulangan ke-i

$\mu_0$  : Pengaruh rata-rata umum perlakuan

$\sigma_j$  : Pengaruh perlakuan taraf ke-j

$\varepsilon_{ij}$  : Pengaruh galat percobaan dari perlakuan taraf ke-j dan ulangan ke-i

Selanjutnya bila hasil sidik ragam menunjukkan pengaruh nyata atau sangat nyata, maka dilanjutkan dengan uji Duncan (Bangun, 1991).

### 3.3.3. Percobaan di Rumah Kaca

Percobaan di rumah kaca dilakukan dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) Non Faktorial dengan 6 taraf perlakuan sebagai berikut :

$A_0$  : Kontrol (+), tanpa asap cair

$A_1$  : Asap cair pada konsentrasi 0,5%

$A_2$  : Asap cair pada konsentrasi 1%

$A_3$  : Asap cair pada konsentrasi 1,5%

A<sub>4</sub> : Asap cair pada konsentrasi 2%

A<sub>5</sub> : Asap cair pada konsentrasi 2,5%

A<sub>6</sub> : Fungisida berbahan aktif mankozeb pada konsentrasi 0,2%

Dengan demikian, maka jumlah ulangan yang akan digunakan adalah sebagai berikut :

$$t(r-1) \geq 15$$

$$7(r-1) \geq 15$$

$$7r-7 \geq 15$$

$$7r \geq 22 \quad r \geq 3,14 (4)$$

Dimana :

t : jumlah perlakuan

r : jumlah ulangan

Jumlah Ulangan : 4 Ulangan

Jumlah Plot : 28 plot

Jumlah tanaman / plot : 3 tanaman

Jumlah seluruh tanaman : 84 cm

Jumlah tanaman sampel / plot : 2 tanaman

Jarak tanaman : 30 cm x 30 cm

Jarak antar plot : 50 cm

Jarak antar ulangan : 50 cm

Jumlah seluruh tanaman : 84 cm

### 3.3.4. Metode Analisis Data

Metode analisis data yang dipakai adalah menggunakan Rancangan Acak Lengkap Non Faktorial dengan rumus model linier aditif :

$$Y_{ij} = \mu_0 + \sigma_j + \varepsilon_{ij}$$

Dimana ;

**Y<sub>ij</sub>** : Hasil Pengamatan yang mendapat perlakuan taraf ke-j dan ditempatkan di ulangan ke-i

**μ<sub>0</sub>** : Pengaruh rata-rata umum perlakuan

**σ<sub>j</sub>** : Pengaruh perlakuan taraf ke-j

**ε<sub>ij</sub>** : Pengaruh galat percobaan dari perlakuan taraf ke-j dan ulangan ke-i

Selanjutnya bila hasil sidik ragam menunjukkan pengaruh nyata atau sangat nyata, maka dilanjutkan dengan uji Duncan (Bangun, 1991).

### **3.4. Pelaksanaan Penelitian**

#### **3.4.1. Pembuatan Asap Cair**

Tempurung kelapa dibakar di dalam drum pembakaran sampai api menyala besar. Kemudian drum pembakaran ditutup dengan penutup yang telah disambung pipa besi untuk mengalirkan asap ke tangki pendingin (kondensor) yang diisi air. Asap yang telah terkondensasi dalam bentuk cair ditampung pada wadah jerigen. Produksi asap cair akan selesai apabila aliran asap cair telah berhenti sebagai tanda bahwa tempurung kelapa telah terbakar sempurna.

#### **3.4.2. Pembuatan Media PDA (*Potato Dextrose Agar*)**

Media biakkan yang akan digunakan dalam penelitian ini adalah media *Potato Dextrose Agar* (PDA). Prodsedur dalam pembuatan media PDA yaitu

menimbang kentang seberat 250 gr kemudian diiris tipis dan direbus dalam 500 ml aquades selama  $\pm$  15 menit . Ekstrak kentang diambil dengan cara menyaring air rebusannya kemudian tambahkan aquades lagi hingga mencapai volume 1 liter. Larutan ekstrak kentang dicampur dengan 20 gr agar dan 20 gr *dextrose* kemudian dipanaskan di atas *hot plate*. Setelah larut sempurna, media dipindahkan ke dalam botol. Media disterilkan dengan menggunakan *autoclave* dengan suhu 121 °C dengan tekanan 1 atm selama 15 menit. Media dituangkan pada masing-masing petridis dalam kondisi steril di *laminar air flow*.

#### **3.4.3. Isolasi dan Inokulasi *C. gloeosporioides* (Metode Balit SP)**

Sumber inokulum diambil dari jaringan tanaman yang diserang oleh *Collectotrichum gloeosporioides* yaitu daun. Sebelum mengisolasi terlebih dahulu dilakukan pengamatan adanya spora atau tidak pada sampel daun yang terserang. Selain itu perlu juga untuk mengamati adanya tungau yang berpotensi akan merusak biakan.

Daun yang terserang penyakit gugur daun *Collectotrichum* dipotong dengan ukuran 1x1 cm pada ruas daun yang terdapat bercak coklat. Kemudian potongan tersebut disterilisasi permukaan dengan cara dicuci dengan air mengalir selama 20 menit. Selanjutnya potongan daun direndam dengan alkohol 75% selama  $\pm$ 2 menit dan dibilas dengan aquades steril sebanyak 2 kali lalu dikeringkan pada suhu kamar. Kemudian diinokulasikan pada media PDA. Inkubasi dilakukan pada suhu kamar selama 3 – 4 hari.

#### **3.4.4. Identifikasi Isolat *C. gloeosporioides***

Koloni jamur yang tumbuh diidentifikasi dengan cara melihat ciri-ciri cendawan dengan menggunakan mikroskop dan menyesuaikan pengamatan dengan pemahaman teori tentang ciri-ciri morfologis dan tipe spora dari buku panduan karangan Semangun (1991).

#### **3.4.5. Pemurnian Isolat *C. gloeosporioides***

Pemurnian isolat mikrobia bertujuan untuk menjaga kemurnian biakan isolat dan tidak terkontaminasi oleh mikrobia lain. Pemurnian dilakukan dengan cara membiakkan kembali jamur yang telah didapat pada media yang sama. Pada waktu pengambilan isolat dari biakan asal, harus diambil dari bagian tepi pertumbuhan. Pengambilan di bagian tengah dari biakan menyebabkan biakan murni yang baru sering terkontaminasi.

#### **3.4.6. Pengujian Asap Cair di Laboratorium**

Asap cair pekat dipipet masing-masing sebanyak 0 ml, 0,75 ml, 1,5 ml, 2,25 ml, 3 ml, 3,75 ml dan fungisida berbahan mankozeb ditimbang 0,3 gr. Kemudian larutan media PDA ditambahkan hingga takaran volume menjadi 150 ml. Masing-masing campuran media perlakuan dituang pada Petridis steril. Bagian hifa pada isolat murni patogen *C. gloeosporioides* dicetak dengan bor gabus (*cork borer*) dan diinokulasikan pada masing-masing media perlakuan.

#### **3.4.7. Inokulasi *C. gloeosporioides* pada Bibit Karet**

Bibit tanaman karet yang digunakan adalah klon PB 260 umur 7 bulan yang memiliki 1 payung. Kemudian bibit tanaman karet disusun di rumah kaca sesuai

dengan pembagian plot perlakuan. Suspensi *C. gloeosporioides* dengan tingkat spora  $4 \times 10^4$  dimasukkan ke dalam botol semprot lalu disemprotkan ke seluruh permukaan daun karet. Setelah disemprot, sungkup dengan plastik transparan dan diinkubasikan selama 2 hari.

### **3.4.8. Aplikasi Asap Cair pada Bibit Karet**

Asap cair diaplikasikan 2 hari setelah patogen *C. gloeosporioides* diinokulasikan pada bibit tanaman karet. Asap cair dengan masing-masing konsentrasi (0,5%, 1%, 1,5%, 2%, dan 2,5%) dan fungisida berbahan mankozeb dengan konsentrasi 0,2% disemprotkan pada permukaan daun secara merata. Aplikasi asap cair dilakukan dengan interval 1 minggu.

## **3.5. Parameter Yang Diamati**

### **3.5.1. Pengamatan di Laboratorium**

#### **Luas Pertumbuhan Koloni *C. gloeosporioides***

Pengamatan luas pertumbuhan koloni *C. gloeosporioides* dimulai pada 2 hari setelah inokulasi (HSI) dengan interval 2 hari sampai luas koloni pada kontrol telah memenuhi petridis (8 HSI). Pengukuran pertambahan luas koloni jamur dilakukan dengan menggambar luas pertumbuhannya pada kertas transparan. Kemudian diukur luasnya dengan menggunakan planimeter.

#### **Persentase Penghambatan**

Persentase penghambatan merupakan tingkat efikasi atau penyembuhan terhadap penyakit *C. gloeosporioides*. Maka pengamatan ini dilakukan pada hari

terakhir pengamatan luas koloni pertumbuhan *C. gloeosporioides*. Untuk mengetahui persentase penghambatan dapat dilakukan dengan menghitung persentase penghambatan asap cair menggunakan rumus :

$$EF = \frac{x - y}{x} \times 100\%$$

Dimana ; EF : Persentase penghambatan

x : Luas koloni pada kontrol

y : Luas koloni pada perlakuan

Perlakuan yang diuji dikatakan efektif apabila tingkat efikasi (TE) lebih besar atau sama dengan 30% (Nasahi, 2009).

### **3.5.2. Pengamatan di Rumah Kaca**

#### **Intensitas Serangan**

Pengamatan intensitas serangan pada tanaman karet dilakukan satu minggu sekali selama 1 bulan. Pengamatan pertama dilakukan pada 7 hari setelah aplikasi (hsa) asap cair. Diamati helai daun tengah pada setiap tangkai sebanyak 10 tangkai daun dan diukur skala serangan menurut Pawirosoemardjo (1999) sebagai berikut :

Skala 0 : Tidak terdapat bercak atau cacat pada daun

Skala 1 : Terdapat bercak atau cacat pada daun 1/16 bagian

Skala 2 : Terdapat bercak atau cacat pada daun 1/8 bagian

Skala 3 : Terdapat bercak atau cacat pada daun 1/4 bagian

Skala 4 : Terdapat bercak atau cacat pada daun 1/2 bagian

Skala 5 : Terdapat bercak atau cacat pada daun > 1/2 bagian

Skala 6 : Daun gugur total

Persentase intensitas serangan penyakit gugur daun *Collectotrichum* menurut Pawirosoemardjo (1999) dihitung dengan rumus :

$$I = \frac{\sum (nxv)}{ZxN} \times 100\%$$

I : Intensitas serangan

n : Jumlah daun dari tiap kategori serangan

v : Nilai skala dari tiap kategori serangan tertinggi

Z : Nilai skala dari kategori serangan tertinggi

N : Jumlah daun yang diamati

### **Persentase Penghambatan Pada Tanaman**

Persentase penghambatan merupakan tingkat efikasi atau penyembuhan terhadap penyakit *C. gloeosporioides*. Maka pengamatan ini dilakukan pada hari terakhir pengamatan intensitas serangan *C. gloeosporioides*. Untuk mengetahui persentase penghambatan dapat dilakukan dengan menghitung persentase penghambatan asap cair menggunakan rumus :

$$EF = \frac{x - y}{x} \times 100\%$$

Dimana ; EF : Persentase penghambatan

x : Intensitas serangan pada kontrol

y : Intensitas serangan pada perlakuan